

Identifikasi *Rhabdovirus carpio* - Bagian 2: Metode *Indirect Fluorescent Antibody* (IFA)



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Peralatan	2
4 Bahan	2
5 Prosedur	2
6 Pembacaan hasil	3
Lampiran A (normatif) Pembuatan media dan pereaksi	4
Bibliografi	5
Gambar 1 - Hasil pengamatan IFAT: antigen SVCV pada sel FHM (Ahne <i>et al.</i> ,2002)	3



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang identifikasi *Rhabdovirus carpio* - Bagian 2: Metode *Indirect Fluorescent Antibody* (IFA).

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 10 November 2011 di Riau, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian, perguruan tinggi, serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.19/Men/2010 tentang Pengendalian sistem jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Identifikasi *Rhabdovirus carpio* – Bagian 2: Metode *Indirect Fluorescent Antibody* (IFA)

1 Ruang lingkup

Standar ini menjelaskan identifikasi *Rhabdovirus carpio* dengan metode IFA.

2 Istilah dan definisi

2.1

antibodi

molekul *imunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam sel dari sel *limfoid* (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut. Antibodi digolongkan menurut cara kerjanya, seperti *agglutinin*, *bakteriolisin*, *hemolisin*, *opsonin*, *presipitin* dan lain-lain

2.2

carrier (pembawa)

suatu individu yang dalam tubuhnya mengandung organisme spesifik suatu penyakit tanpa menunjukkan gejala-gejala dan mampu membawa infeksi

2.3

cytophatic effect (CPE)

efek yang ditimbulkan berupa perubahan patologi dalam kultur sel

2.4

fluorescein isothiocyanat (FITC)

zat warna yang berpendar (*fluorescent*) bila terpapar sinar ultraviolet, menampilkan warna hijau

2.5

homogenat

cairan yang berasal dari hasil gerusan organ yang diencerkan dan dihomogenisasi

2.6

indirect fluorescent antibody (IFA)

deteksi antibodi terhadap bahan antigenik tertentu dalam suatu substrat menggunakan mikroskop fluorescent

2.7

infeksi sistemik

tipe infeksi dari suatu penyakit yang menginfeksi seluruh tubuh

2.8

numerical aperture (na)

ukuran besarnya celah yang dilewati cahaya

2.9

penyakit viral

penyakit yang disebabkan oleh virus

2.10

preparasi

proses pemisahan organ target dari tubuh ikan

2.11

Rhabdovirus carpio

merupakan jasad penyebab penyakit dari *spring viraemia of carp* (SVC)

2.12

spring viraemia of carp (SVC)

penyakit ikan yang disebabkan oleh infeksi *spring viraemia of carp virus* (SVCV), termasuk dalam famili *Rhabdoviridae* dan secara sementara dimasukkan dalam genus *Vesiculovirus*, merupakan *single strand* (ss) RNA virus dengan polaritas negatif, yang dapat menyebabkan infeksi sistemik

3 Peralatan

- a) inkubator;
- b) mikroskop *fuorescent*;
- c) mikropipet 20 µl - 200 µl dan 100 µl – 1 000 µl,
- d) pH meter;
- e) *refrigerator*;
- f) *plate* kultur sel plastik dengan ukuran sumuran 2 cm² atau *coverslip*.

4 Bahan

- a) aseton 30 % (disimpan pada suhu -20 °C);
- b) antibodi *polyclonal* yang telah dimurnikan;
- c) larutan *fluorescein isothiocyanate* (FITC);
- d) etanol 70 % (disimpan pada suhu -20 °C);
- e) *glycerol saline* pH 8,5;
- f) *Phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,2;
- g) Sel *monolayer fathead minnow* (FHM) atau *epithelioma papulosum cyprini* (EPC);
- h) *tween* 80
- i) mikrotip 200 µl dan 1 000 µl .

CATATAN Pembuatan media dan pereaksi diuraikan dalam Lampiran A.

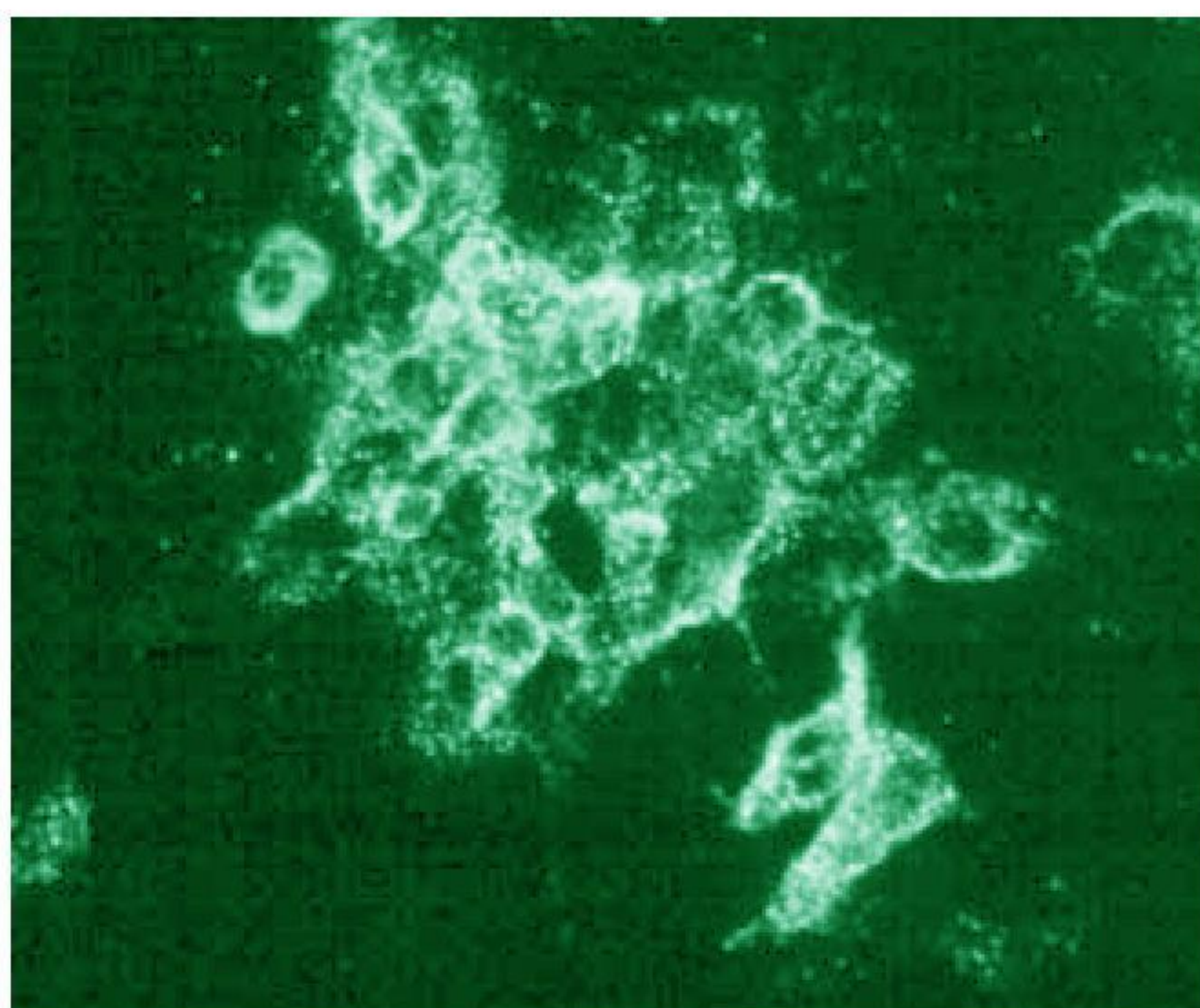
5 Prosedur

- a) siapkan sel *monolayer* di dalam sumuran berukuran 2 cm² dari *plate* kultur sel plastik atau pada *cover slip*.
- b) inkubasikan pada suhu 30 °C selama 4 jam sampai mendekati 80 % pertumbuhan.
- c) encerkan virus yang akan diuji langsung dalam botol kultur atau sumuran. Pengenceran dilakukan bertingkat 10 kali.
- d) encerkan suspensi kontrol virus *Rhabdovirus carpio* dengan cara yang sama untuk memperoleh titer virus 5 000 *plaque forming unit* (PFU) – 10 000 *plaque forming unit* (PFU) per ml di dalam medium kultur sel.
- e) inkubasikan pada suhu 20 °C - 22 °C selama 18 jam.
- f) buang media kultur sel, dan bilas satu kali dengan 0.01 M *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,2.

- g) bilas *cover slip* secara cepat sebanyak tiga kali menggunakan aseton dingin (aseton dingin disimpan pada suhu -20°C).
- h) bilas sumuran plastik dengan larutan aseton 30 % dalam etanol 70 % (V/V) yang juga disimpan pada suhu -20°C .
- i) fiksasi, 0,25 ml larutan fiksatif (aseton dingin atau larutan aseton 30 % dalam etanol 70 % (V/V)) untuk setiap cm^2 sel *monolayer* selama 15 menit.
- j) keringanginkan sel *monolayer* lebih kurang 30 menit.
- k) siapkan larutan antibodi *polyclonal* yang telah dimurnikan atau serum terhadap *Rhabdovirus carpio* di dalam 0,01 M PBS pH 7,2 berisi 0,05 % Tween 80 (PBST) pada pengenceran yang tepat yang sudah dibuat sebelumnya.
- l) *rehidras*i sel *monolayer* secara bertingkat (4 tahap) dengan menggunakan larutan PBST dan buang habis *buffer* setelah pembilasan terakhir.
- m) tambahkan larutan antibodi ke sel *monolayer* selama 1 jam pada suhu 37°C pada tempat/ wadah yang lembab. Volume larutan antibodi yang digunakan 0,125 ml/ cm^2 sel *monolayer*.
- n) bilas 4 kali dengan PBST seperti pada poin l.
- o) tambahkan antibodi yang telah dikonjugasi dengan FITC ke sel *monolayer* dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C .
- p) bilas 4 kali dengan PBST seperti pada poin l.
- q) amati segera sel-sel yang telah diberi perlakuan di dalam wadah plastik. Sementara sel yang ditempatkan pada *cover slip* ditetesi *glycerol* saline pH 8,5 sebelum dilakukan pengamatan mikroskop.
- r) periksalah di bawah sinar UV dengan menggunakan mikroskop *fluorescent* dengan perbesaran 200 kali – 400 kali lensa objektif dengan *na* (*numerical aperture*) tinggi. Kontrol positif dan negatif harus memberikan hasil dalam pengamatan ini.

6 Pembacaan hasil

SVCV positif ditandai adanya konjugasi antara virus dengan antibodi yang sudah di label dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC) sehingga terlihat berpendar hijau saat pengamatan.



Gambar 1 - Hasil pengamatan IFAT: antigen SVCV pada sel FHM (Ahne *et al.*, 2002)

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan media dan pereaksi

A.1 Phosphate Buffer Saline (PBS)

Bahan:

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Akuades sampai	1 000 ml

Cara membuat:

- larutkan semua bahan diatas ke dalam 800 ml akuades.
- aduk hingga semua bahan larut.
- kemudian sesuaikan pH 7,2.
- tambahkan akuades sampai 1 000 ml.
- sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

A.2 Glycerol saline pH 8,5

Bahan:

Glycerol	650 ml
1 M MgSO ₄	100 ml
1 M Tris (pH 8)	25 ml
Akuades sampai	1 000 ml

Cara membuat:

- larutkan semua bahan di atas ke dalam 800 ml akuades
- sesuaikan pH 8,5
- tambahkan akuades sampai 1 000 ml
- sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C

Bibliografi

Ahne, W., Bjorklund, H.V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. & Winton, J.R. 2002. *Spring viremia of carp (SVC)*. *Dis. aquat. Org.* 52: 261–272.

OIE, 2011. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal*. Office des International des Epizooties (OIE).

Sano, M., Nakai, T. & Fijan, N. 2011. *Viral Diseases and Agents of Warmwater Fish*. In: Woo P.T.K. & Bruno D.W. (eds). *Fish Diseases and Disorders Vol. 3: Viral, bacterial and fungal infections*. 2nd ed. CAB International, UK. 166–244.

